

KR04/01435

PCT/KR 2004/00143
RO/KR 16.06.2004

REC'D-06 JUL 2004

PCT

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2004-0043909
Application Number

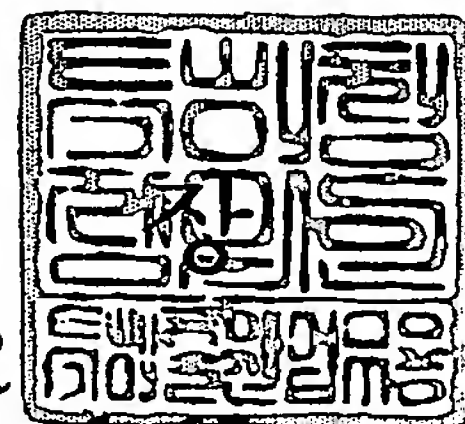
출원년월일 : 2004년 06월 15일
Date of Application JUN 15, 2004

출원인 : 이경림
Applicant(s) LEE KYUNG LIM



2004 년 06 월 16 일

특허청
COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.06.15
【발명의 명칭】	포유류의 티씨티피 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법
【발명의 영문명칭】	Composition for screening anti-hypertension drug comprising mammal TCTP gene or its protein product, and method for screening anti-hypertension drug using said composition
【출원인】	
【성명】	이경림
【출원인코드】	4-2000-026470-8
【대리인】	
【명칭】	특허법인다래
【대리인코드】	9-2003-100021-7
【지정된변리사】	박승문 , 조용식, 윤정열, 김정국, 안소영, 김희근, 김준한
【포괄위임등록번호】	2003-043075-0
【발명자】	
【성명】	이경림
【출원인코드】	4-2000-026470-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오구택
【성명의 영문표기】	OH, Goo Taeg
【주민등록번호】	641120-1923611
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 133동 1106호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조명찬
【성명의 영문표기】	CH0, Myeong Chan
【주민등록번호】	580219-1119930

【우편번호】	361-711
【주소】	충청북도 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교병원 순환기내과
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김민정
【성명의 영문표기】	KIM,Min Jeong
【주민등록번호】	760324-2690615
【우편번호】	440-320
【주소】	경기도 수원시 장안구 울전동 상호진덕아파트 208-605
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2003-0040519
【출원일자】	2003.06.21
【증명서류】	미첨부
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	유전자은행 KCTC
【수탁번호】	KCTC 10640BP
【수탁일자】	2004.05.21
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	2
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 특허법인다래 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	0 면 38,000 원
【가산출원료】	32 면 0 원
【우선권주장료】	1 건 20,000 원
【심사청구료】	16 항 621,000 원

1020 13909

출력 일자: 2004/6/28

【합계】	679,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	217,700 원
【첨부서류】	1. 미생물기탁증명서[추후제출]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 포유류의 TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP는 나트륨/칼륨 ATP아제 펌프의 세포질 내 억제자로 작용하여, 고혈압 및 심장비대증을 유발한다.

따라서, 본 발명의 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법은 항고혈압제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 TCTP를 과다발현하는 형질전환 마우스는 고혈압 및 심장비대증을 표현형으로 나타내어, 고혈압 또는 심장비대의 치료 및 개선을 위해 개발된 시험대상물질을 투여하여 치료 및 개선 정도를 관찰함으로써, 시험대상물질 스크리닝시 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 5

【명세서】

【발명의 명칭】

포유류의 티씨티피 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법 {Composition for screening anti-hypertension drug comprising mammal TCTP gene or its protein product, and method for screening anti-hypertension drug using said composition}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 스크리닝용 조성물이 포함하는 TCTP의 나트륨/칼륨 APT아제 펌프 저해 활성을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 스크리닝용 조성물이 포함하는 TCTP를 과다발현하는 형질전환 마우스 제작에 필요한 유전자 지도를 나타낸 도이다.

도 3은 TCTP 과다발현 형질전환 마우스의 꼬리에서 추출한 게놈 DNA에 TCTP 외래 유전자가 삽입되었음을 확인한 도이다.

도 4는 TCTP 과다발현 형질전환 마우스의 장기에서 TCTP 단백질의 과다발현을 확인한 도이다.

도 5는 TCTP 과다발현 형질전환 마우스에서 고혈압 증상을 확인한 도로, 도 5a는 본 발명의 형질전환 마우스의 꼬리 수축기 혈압을 측정한 도이고, 도 5b는 형질전환 마우스의 경동맥 수축기 혈압을 측정한 도이고, 도 5c는 형질전환 마우스의 좌심실 수축기 혈압을 측정한 도이다.

도 6은 TCTP 과다발현 형질전환 마우스에서 심장비대증 발현을 확인한 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <7> 본 발명은 항고혈압제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- <8> TCTP 단백질(translationally controlled tumor protein)은, 1979년 튜어슨 등에 의해 배양된 인간단핵세포에서 히스타민 유리활성을 나타내는 것으로 처음 보고되어 histamine-releasing factor(HRF)의 기능을 밝힌 논문(Thueson *et al.*; *J Immunol.*, 123(2):626-32, 1979)에서와 같이 히스타민 방출 기능이 있는 것으로 알려져 있는 단백질이다.
- <9> HRF는 활성화된 면역세포의 생성물로, 염기성구, 비만세포와 상호작용하여 히스타민 유리를 유발하는 물질로 정의되었으며, 그 후 두 가지 종류로 분류되었다. 한 가지는 히스타민 유리시 세포 표면의 IgE를 필요로 하며, 다른 하나는 IgE에 비의존적으로 작용한다. 이 중 IgE 의존적 히스타민 방출 인자(IgE-dependent histamine-releasing factor, HRF)는 항원 없이 염기성구로부터 히스타민 유리를 촉발하여, 후기 알러지성 염증반응의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.
- <10> HRF 단백질은 마우스에서는 21 kDa 크기의 폴리펩티드라는 의미에서 P21으로 불리우며, 사람에서는 P23으로 알려져있다. HRF의 발현은 1988년에 혈청에 의해 번역 수준(translation level)에서 조절되는 것이 밝혀졌으며, 납, 구리, 카드뮴 등에 의해 전사 수준(transcription level)에서 조절되는 것이 알려지면서 TCTP라는 명칭을 갖게 되었다.

- 11> P21은 2D-PAGE 참조 지도(reference map)로 등전점(isoelectric point)이 4.9이고 분자량이 24kDa인 산성 펩티드임이 보고되었다. 그 후, MacDonald *et al.*(*Science*, 269:688-690, 1995)에 의해 아토피 환자의 림프구와 알러지 환자의 생물학적 체액(biological fluids)에서 HRF가 분리, 정제되었으며, 그 아미노 말단 서열확인(amino-terminal sequencing)을 통해 이 단백질은 성장 조절 단백질(growth-related protein)로 알려져 왔던 TCTP와 동일한 단백질이라는 사실이 밝혀졌다.
- 12> TCTP는 1980년대까지 종양에 관련된 단백질(tumor-specific protein)로 알려져 왔으며, 그 합성은 종양의 증식 단계(proliferative stage)와 관련이 있을 것으로 생각되어왔다. 그러나 TCTP가 신장(kidney)과 신장 세포암(renal cell carcinoma)을 제외한 모든 정상세포에서 발견될 뿐 아니라, 거의 모든 종에 있어 높은 동일성(homology)을 나타낸다는 것이 보고되었다.
- 13> 따라서 TCTP는 세포 내에서 매우 중요한 역할을 수행하며 언제나 일정수준으로 발현되는 단백질(housekeeping protein)일 것으로 생각되나, 그 명확한 기능은 알려진 바 없다.
- 14> 본 발명자들은 대한민국 특허출원번호 10-2001-0027896에 공지한 바와 같이, TCTP와 동일한 단백질로 밝혀진 HRF가 나트륨/칼륨 APT아제 펌프(Na,K-ATPase pump)의 소단위체(subunit)의 3번째 세포질 루프(cytoplasmic loop)와 상호작용함을 밝힌 바 있다.
- 15> TCTP는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 3번째 세포질 부분을 미끼(bait)로 하여 쥐의 골격근 라이브러리(rat skeletal muscle library)에 대해 효모 이중혼성법(Yeast two-hybrid)을 시행한 결과 얻은 단백질이다. 그 상호작용은 동형 특이적(isoform specific)이지 않으며, 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 5개 세포질 부분 중에서 단지 3번째 부분과 상호작용을 한다. 이들 상호작용은 바이아코어 분석(biacore assay), 공면역침전법(coimmunoprecipitation), 공춧점 현

미경(confocal microscope)을 통해서 재차 확인되었다. 이때 TCTP는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 세포질 억제제(cytoplasmic repressor)로 작용하는 것으로 나타났다.

- 6> 나트륨/칼륨 APT아제 펌프는 세포막에 존재하며, 2개의 소단위체, 즉 112 kDa 크기의 소단위체와 55 kDa 크기의 소단위체로 구성된 막단백질이다. 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 가장 중요한 작용은 막을 가로지르는 이온 수송을 통해 세포 내 K^+ 이온의 농도를 높게 유지하고 세포 밖에서의 Na^+ 이온의 농도를 높게 함으로써, 결과적으로 세포 내 Na^+ 과 K^+ 이온들의 농도조절을 하는 것이다.

- 17> 또한 나트륨/칼륨 APT아제 펌프는 단백질-단백질 간의 상호작용시 신호전달분자로도 작용한다. 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 이온 농도 조절기능을 저해하는 물질은 글리코시드(glycoside) 계통의 우아바인(ouabain), 디곡신(digoxin), 디지톡신(digitoxin) 등이 있는데, 이들 글리코시드류를 오래 복용하면 혈관이 수축되고 혈압이 증강한다. 이는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 기능 저하로 인한 세포 내 Na^+ 및 Ca^{2+} 농도의 증가가 그 원인인 것으로 생각된다.

- 18> 이와 관련하여 세포 내에 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 활성을 저해하는 우아바인과 비슷한 내재성 인자(endogenous ouabain-like factor)가 존재하며, 이것이 고혈압(hypertension)과 심장비대증(heart hypertrophy)을 유발하는데 기여한다는 가설이 제기되어 왔다. 최근에는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프가 저해되면 EGFR와 상호 교류(cross talk)를 하여 NF- κ B를 활성화함으로써 심장비대증을 유발할 수 있다는 실험적 증거도 제시된 바 있다(Haas, M., Askari, A., and Xie, Z., *J. Biol. Chem.*, 275:27832-27837, 2000).

9> 따라서 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 저해제는 결과적으로 고혈압 및 심장비대증을 유발할 것으로 예상되며, 이러한 저해제의 활성을 억제할 수 있는 물질의 효과적인 스크리닝은 항고혈압제제의 개발에 있어 매우 중요할 것이다.

10> 이에, 본 발명자들은 TCTP가 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 활성 저해를 통해 고혈압 및 심장비대증을 유발함을 밝히고, 이를 이용한 항고혈압제 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

21> 본 발명에서는 포유류의 TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 함유하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물과, 상기 조성물을 이용하여 항고혈압제를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성】

22> 본 발명은 포유류의 TCTP 유전자를 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

23> 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP 유전자는 거의 모든 종의 포유류 세포에서 발견되는 유전자로, 서열번호 1의 염기서열 구조, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴(disruption), 결실(deletion), 삽입(insertion), 점(point), 치환(substitution), 논센스(nonsense), 미스센스(missense), 다형(polymorphism), 재배열 돌연변이(mutation)가 일어난 것 중 선택된 하나일 수 있다.

24> 본 발명은 포유류의 TCTP 단백질을 포함하는 스크리닝용 조성물을 제공한다.

25> 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP 단백질은 거의 모든 종의 포유류 세포에서 언제나 일정수준으로 발현되는 단백질(housekeeping protein)로, 서열번호 2의 아미노산 구조를 갖거나,

또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현될 수 있으며, TCTP와 동등한 생리적 활성을 나타내는 폴리펩티드 단편일 수 있다.

- 6> 또한 본 발명은 상기 TCTP 유전자를 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법을 제공한다.
- 7> 본 발명은 상기 TCTP 유전자를 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 조성물이 포함하는 유전자의 발현을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어지는 항고혈압제 스크리닝 방법을 제공한다.
- 8> 또한 본 발명은 상기 TCTP 단백질을 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 항고혈압제 스크리닝 방법을 제공한다.
- 9> 본 발명은 상기 TCTP 단백질을 포함하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 조성물이 포함하는 단백질의 기능을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어지는 항고혈압제 스크리닝 방법을 제공한다.
- 30> TCTP는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 대형 세포질 루프와 결합하는 단백질로, 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 세포질 내 억제자로 작용하여(도 1), 고혈압 및 심장비대증을 유발한다.
- 31> TCTP가 고혈압 및 심장비대증을 유발하는 기전은, 나트륨/칼륨 APT아제 펌프 작용이 저해되면 혈관 평활근 근육 및 심장 근육의 반응도와 수축도, 그리고 뇌의 신경전달물질 분비에 영향을 미쳐 고혈압을 유발하는 현상과 관련이 있을 것으로 보인다.
- 32> TCTP가 과다발현되도록 형질전환된 마우스는 정상 마우스에 비해 현저한 고혈압 증상(도 5)과 심장비대증 표현형을 나타낸다(도 6).

- 33> 따라서, 본 발명에서는 TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 본 발명의 조성물을 표적물질로 이용하여 항고혈압제를 스크리닝한다.
- 34> 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 유전자의 발현을 억제하거나 또는 상기 단백질의 기능을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어진다.
- 35> 본 발명의 스크리닝 방법에서 TCTP 유전자를 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- 36> 예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 시험대상물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석을 통한 상기 유전자의 발현률 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현율을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- 37> 이러한 경우 본 발명의 조성물은 TCTP 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.
- 38> 본 발명의 스크리닝 방법에서 TCTP 단백질을 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- 39> 예를 들면, TCTP 유전자 또는 단백질과 시험대상물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), TCTP 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클

론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

<40> 이러한 경우 본 발명의 조성물은 TCTP로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내(in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

<41> 본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 항고혈압제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물 등이 될 수 있다.

<42> 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은 항고혈압제 후보물질은 이후의 항고혈압제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질에 대해 TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 항고혈압제를 개발할 수 있다.

<43> 이렇게 하여 얻어진 물질은 포유류의 TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 억제효과를 나타내게 되므로, TCTP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 의한 고혈압과 심장비대증, 그의 유발되는 질환들을 억제할 수 있다.

- 44> 따라서, 본 발명의 조성물 및 이를 이용하는 스크리닝 방법은 포유류를 비롯한 병원성 세균들에 대한 항고혈압제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.
- 45> 본 발명은 또한 수정란 단계에서 포유류의 TCTP 유전자가 도입되어, 체세포와 생식세포에 포유류의 TCTP 유전자를 포함하고, 이로부터 TCTP 단백질이 과다발현되어 고혈압 및 심장비대증의 표현형을 나타내는 형질전환 마우스를 제공한다.
- 46> 본 발명의 형질전환 마우스에서 상기 TCTP 유전자는 서열번호 1의 염기서열 구조; 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 것 중 선택된 하나가 될 수 있다.
- 47> 본 발명의 형질전환 마우스에 도입된 TCTP 유전자는, 수정란에 주입시 마우스 형질전환 벡터에 삽입된 상태로 주입되며, 바람직하게 TCTP 유전자는 사이토메갈로 바이러스 인핸서(CMV-IE), 치킨 베타 액틴 프로모터(chicken beta-actin promoter) 및 래빗 베타 글로빈 폴리 에이 테일(rabbit beta-globin poly A-tail)을 함유하는 형질전환 벡터 DNA 내에 삽입된 것이 될 수 있다.
- 48> 본 발명의 형질전환 마우스를 제작하기 위한 수정란은 순종 또는 혼혈종 마우스로부터 유래한 수정란을 사용할 수 있다. 바람직하게는, C57BL/6N 순종 마우스 또는 C57BL/6J + CBA/N 혼혈종 마우스를 사용할 수 있다.
- 49> 본 발명의 TCTP를 과다발현하는 형질전환 마우스의 수정란은 2004년 5월 21일자로 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 수탁번호 KCTC 10640BP로 기탁되었다.
- 50> 또한, 본 발명은 TCTP 과다발현 형질전환 마우스 제조방법을 제공한다.

- 51> 본 발명의 TCTP 과다발현 형질전환 마우스 제조방법은, 1) 포유류의 TCTP 유전자를 형질 전환 벡터에 삽입시켜 형질전환용 재조합 유전자 구조물을 제조하는 제 1단계; 2) 상기 제 1 단계의 재조합 유전자 구조물을 마우스의 수정란의 웅성 전핵에 미세주입하는 제 2단계; 3) 상기 미세주입된 수정란을 대리모 마우스에 이식하는 제 3단계; 및 4) 상기 대리모 마우스의 자손 중 TCTP 유전자가 게놈 DNA에 삽입되고, TCTP 단백질을 발현하며, 고혈압 또는 심장비대증의 표현형을 나타냄을 확인하여 TCTP 과다발현 형질전환 마우스를 선별하는 제 4단계를 포함하여 이루어진다.
- 52> 상기 제1단계에 있어서, 포유류의 TCTP 유전자는 서열번호 1의 염기서열 구조, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 것 중 선택된 하나를 사용할 수 있다.
- 53> 또한 제 1단계의 형질전환 벡터는 당업계에 공지된 마우스의 형질전환용 벡터를 사용할 수 있으며, 벡터내의 프로모터(promoter)는 전체 조직에 발현시키는 프로모터 또는 조직 특이적으로 발현시키는 프로모터를 사용할 수 있으며, 프로모터를 활성화시키는 인핸서(enhancer) 및 종결자(terminator) 이후에 폴리 에이 테일 등을 함유한다. 바람직하게는 사이토메갈로 바이러스 인핸서(CMV-IE), 치킨 베타 액틴 프로모터(chicken beta-actin promoter) 및 래빗 베타 글로빈 폴리 에이 테일(rabbit beta-globin poly A-tail)을 함유하는 벡터를 사용할 수 있다.
- 54> 포유류의 TCTP 유전자를 마우스의 형질전환 벡터에 삽입하여 형질전환용 재조합 유전자 구조물을 제작한 후, 이의 DNA 염기서열을 확인한 다음, 다량으로 생산하고 여러 단계로 정제하여, 미세주입(microinjection)을 위해 적당한 DNA 농도가 되도록 미세주입용 용액에 희석하여 준비한다.

- 5> 상기 제 2단계에서 TCTP 유전자를 미세주입할 수정란은 순종 또는 혼혈종의 마우스에서 준비하고, 준비된 마우스의 수정란에 미세조작기(micromanipulator)를 이용하여 마우스 수정란의 응성 전핵(male pronucleus)에 미세주입하고 유전자가 핵 내로 주입되는지의 여부는 응성 전핵의 팽창으로 확인한다. 이렇게 TCTP 유전자가 미세주입된 수정란들은 CO₂ 배양기에서 2세 포기까지 배양한다.
- 6> 상기 제 3단계에서 상기 제 2단계의 외래유전자를 미세주입한 수정란을 이식하기 위한 대리모 마우스는 ICR 계통의 암컷 마우스를 정관수술한 수컷 마우스와 수정란 채취 하루 전에 교미시켜 준비한다. 그 다음 상기단계에서 제조한 TCTP 유전자를 미세주입한 수정란을 대리모의 난관에 이식한다.
- 57> 상기 제 4단계에서는, 수정란 이식 후 대리모 마우스에서 자손들이 태어나게 되고, 태어난 자손에게서 도입된 TCTP 유전자의 도입 및 발현을 확인하기 위하여, 꼬리에서 DNA 및 단백질을 추출하여 TCTP 유전자가 마우스 게놈 DNA에 삽입되고, TCTP 단백질을 발현하며, 고혈압 또는 심장비대증의 표현형을 나타냄을 확인하여, 본 발명의 TCTP 과다발현 형질전환 마우스를 선별한다.
- 58> 상기의 형질전환 마우스를 제작하는 방법은 기존에 공지된 다양한 방법(Ian J. Jackson; Catherine M. Abbott; Mouse genetics and transgenics : a practical approach, Oxford ; New York : Oxford University Press, 2000)을 그대로 적용시키거나 변형시켜 제작할 수 있다.
- 59> 본 발명은 TCTP 과다발현 형질전환 마우스에 시험대상물질을 투여한 후 고혈압 및 심장비대증의 증상 개선 정도를 관찰하여 스크리닝함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법을 제공한다.

- 1> 이하 실시예에서 본 발명을 보다 상세히 설명하되, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 국한되는 것은 아니다.
- 1> [실시예] 본 발명의 조성물의 항고혈압제 스크리닝 용도의 확인
- 2> 1) 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP 단백질의 나트륨/칼륨 APT아제 펌프 저해 활성 확인
- 3> 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP 단백질의 나트륨/칼륨 APT아제 펌프 저해 활성을 확인하였다. TCTP가 나트륨/칼륨 APT아제 펌프와 상호작용한다는 것은 공지된 바이므로, 이 상호작용이 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 활성화에 어떤 영향을 미치는가를 확인하였다.
- 4> RBL-2H3 세포를 적정밀도로 배양한 후, 크렙스-링거 완충액(Krebs-Ringer buffer)(KRP, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 1.4 mM CaCl₂, 2.5 mM 글루코스, pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 계속해서 세포를 37℃에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1mM 우아바인(ouabain)을 포함한 0.1% 소 혈청 알부민(BSA) 함유 KRP 완충액을 가하였다.
- 5> 나트륨/칼륨 APT아제 펌프에 의한 K⁺의 이동을 측정하기 위해, 우아바인에 대해 높은 감수성을 지닌 ⁸⁶Rb⁺(0.5 Ci/ml, NEN)을 추적자(tracer)로 사용하여 5~10분 동안 배양하고 10~20 g/ml TCTP를 가하였다. 이때 TCTP를 가하지 않은 대조군도 함께 준비하여 ⁸⁶Rb⁺ 이동량, K⁺ 소비량을 측정하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- 6> 도 1a에 나타난 바와 같이, TCTP는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 활성도를 53.5 %까지 크게 감소시켰다.
- 7> 상기 결과를 재차 확인하기 위해, 나트륨 민감성 염색물질(Na-sensitive dye)을 이용하여 FACS 분석을 수행하였다.

- 38> 도 1b에 나타난 바와 같이, TCTP는 Na 수송이 원활하게 이루어지는 대조군(Mock)과는 달리 세포 내 $[Na^+]$ 의 농도를 증가시켰다.
- 39> 따라서 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP는 나트륨/칼륨 APT아제 펌프의 이온 농도 조절활성을 억제하며, 나트륨/칼륨 APT아제 펌프에 대한 세포질 억제자임을 알 수 있다.
- 70> 2) 본 발명의 조성물에 의한 고혈압 및 심장비대증 유발 확인
- 71> 본 발명의 조성물이 포함하는 TCTP를 지속적으로 과다발현하는 세포에서 고혈압과 심장비대증을 유발됨을 확인하기 위해, TCTP 과다발현 형질전환 마우스(TCTP transgenic mouse)를 제작하였다.
- 72> 2-1) TCTP 과다발현 형질전환 마우스의 제작 1
- 73> 본 발명의 TCTP 과다발현 형질전환 마우스는 C57BL/6N 순종(inbred)의 마우스에서 제작되었다. 형질전환 마우스의 제작 과정에 있어 마우스 수정란의 채취, 수정란에 유전자의 미세주입, 대리모에 수정란 이식 등의 동물실험은 ㈜마크로젠에 의뢰하여 제작하였다.
- 74> TCTP 과다발현 형질전환 마우스의 제작에 사용된 유전자 지도는 도 2에 나타내었다. 이 유전자 지도는 TCTP가 형질전환 마우스의 전체 조직에서 발현되도록 고안되었으며, 이때 생명공학연구원 실험동물실에서 제공한 사이토메갈로 바이러스 인핸서(CMV-IE) 및 치킨 베타 액틴 프로모터(chicken beta-actin promoter)를 사용하였다.
- 75> 이 유전자 구조물을 C57BL/6N 순종 마우스의 수정란에 미세주입하기 위하여 준비하는 과정은 다음과 같다.

- 6> 먼저, TCTP cDNA를 유전자 재조합 과정을 통하여 사이토메갈로 바이러스 인핸서 및 치킨 베타 액틴 프로모터를 함유한 벡터 DNA에 넣은 후 이를 DNA 염기서열 확인 방법으로 최종 확인하였다.
- 7> 이들 DNA를 Qiagen DNA 정제 키트를 이용하여 다량 회수한 후, 제한효소 BamHI / SalI 을 처리하여 DNA 단편을 만들고 이를 로우 멜팅 아가로스 젤(low-melting agarose gel)에서 전기영동하여 약 3Kbp에 해당하는 인핸서, 프로모터, TCTP cDNA 및 래빗 베타 글로빈 폴리 에이 테일(rabbit beta-globin poly A-tail)을 함유한 DNA 단편 부분을 얻었다. DNA 단편을 포함하는 젤을 잘라내어 고농도의 염으로 이루어진 완충액(high salt buffer : 20 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.4)으로 분리하였다. 이렇게 회수한 DNA를 Elutip-D (Schleicher & Schuell) 컬럼을 이용하여 최종 정제한 후 DNA 농도를 측정하여 약 4-6 ng/ μ l이 되도록 미세 주입용 용액 (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)에서 투석하여 조정된 다음 DNA 용액을 50 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 저장해 두고 사용하였다.
- 78> TCTP 유전자의 미세주입은 미세조작기(micromanipulator : Leitz, Germany)를 이용하여 마우스 수정란의 웅성 전핵에 주입하였으며 유전자가 핵 내로 주입되는지의 여부는 웅성 전핵의 팽창으로 확인하였다.
- 79> 외래 유전자를 미세주입한 수정란을 이식하기 위한 대리모 마우스를 준비하는 과정은 다음과 같다. 자연적인 상태에서 발정기를 나타내는 ICR 계통의 자성생쥐를 수정란 채취 하루 전에 교미를 시키는데, 이 때 사용되는 웅성 생쥐는 정관수술을 실시한 생쥐이며, 적어도 3일 이상 교미를 하지 않은 상태의 웅성 생쥐를 사용하여 1:2로 교미를 시키며, 다음 날 아침 자성 생쥐의 질전의 유무(vaginal smear)를 확인하여 교미가 이루어진 (plugged) 자성 생쥐를 대리모로 사용하였다.

- 0> TCTP 유전자가 미세주입된 수정란들은 CO₂ 배양기에서 2세포기까지 배양한 후, 건강한 상태의 수정란을 선별하여 이식하였다. 먼저 마취제(Avertin)를 대리모에 0.5 mg/체중 10 g 양으로 복강 주사하여 전신 마취를 실시한 후, 가친의 배측 정중선을 약 1 cm 가량 절개하고 난소, 난관을 들어내어 각각의 난관에 수정란을 이식한 후 난관의 팽대부가 약간 부풀어 오르는 것을 확인한 다음 복강내로 다시 난관과 난소를 잘 넣고 근육층과 표피를 봉합하였다.
- 11> 대리모에서 태어난 산자의 TCTP 유전자 발현여부를 확인하기 위해 산자의 꼬리를 약 0.5 cm 정도 잘라낸 후, 프로테나제 K(proteinase K)가 함유된 용해 완충액(lysis buffer)을 이용하여 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하고, PCR을 실시하여 TCTP 유전자의 생식라인 전달(germline transmission) 여부를 판별하였다. 또한 상기 마우스의 뇌, 심장, 간, 지라, 신장, 폐 등의 장기에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 수행하여 TCTP 단백질의 발현도 조사하였다.
- 32> 그 결과, C57BL/6N 순종 마우스에서 TCTP 유전자를 과다발현하는 것이 확인된 TCTP 형질 전환 마우스를 수득하였고, 이의 수정란을 2004년 5월 21일자로 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 수탁번호 KCTC 10640BP로 기탁하였다.
- 83> 2-2) TCTP 과다발현 형질전환 마우스의 제작 2
- 84> 본 발명의 TCTP 과다발현 형질전환 마우스는 C57BL/6J + CBA/N의 혼혈종(hybrid)을 이용하여 상기 실시예 2-1)의 방법과 동일하게 제작하였다.
- 85> 혼혈종으로 제작된 TCTP 과다발현 형질전환 마우스를 대상으로 상기 실시예 2-1)에서의 PCR 및 웨스턴 블롯팅을 실시하여, TCTP 유전자의 삽입여부 및 TCTP 단백질 발현 여부를 확인하였다.

- 16> 그 결과, 도 3의 전기영동 사진을 보면, 레인(lane) 2는 양성 대조군으로, 레인 6에서 양성 대조군과 같은 위치의 PCR 산물이 관찰됨으로써, 레인 6의 산자가 TCTP 외래 유전자가 삽입된 것임을 확인하였다.
- 17> 그리고, 상기 마우스의 뇌, 심장, 간, 지라, 신장, 폐 등의 장기에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯팅을 수행하여, 형질전환 마우스의 장기에서는 모두 TCTP 단백질이 제대로 발현됨을 확인하였다(도 4 참조).
- 38> 2-3) TCTP 과다발현 형질전환 마우스에서 고혈압 및 심장비대증 유발 확인
- 39> 상기 실시예 2-2)에서 제작된 TCTP 과다발현 형질전환 마우스 혼혈종의 암수 각각에 대해, 꼬리 차단 수축기 혈압 측정법(SBP measurement by tail-cuff method) 및 카테터를 삽입하여 마우스의 경동맥 수축기 혈압과 심장좌심실 수축기 혈압을 측정하는 직접법을 이용하여 혈압상승도를 확인하고, 좌심실 비대(left ventricular hypertrophy) 정도를 측정하여 심장 비대 여부를 확인하였다.
- 90> 꼬리 차단 수축기 혈압(Tail systolic blood pressure, T-SBP) 측정은 computerized tail-cuff system(BA-98A system, Softron Co)을 이용하여 측정하였다. 11주령에 해당하는 마우스부터 혈압 측정을 시작하였으며 같은 마우스를 가지고 주령에 따라 1주일 간격으로 혈압을 측정하였다. 이 때 주령별 마우스를 컨트롤 및 형질 전환 마우스에 따라 암수로 각각 분리하여 네 개의 그룹으로 나누었으며 각각의 그룹에서는 최소한 3마리의 마우스를 선정하여 혈압을 측정하였다.
- 91> 또한 생후 5-6 주령의 형질전환 마우스에서부터 9-12 주령, 19-20 주령의 마우스 암수 각각에서 1.4 French high-fidelity micromanometer catheter를 마우스의 경동맥에 직접 삽입

하여, 경동맥에서의 수축기 혈압(carotid systolic blood pressure, C-SBP)을 측정하였고, 이 카테터를 심장 좌심실까지 밀어 넣어 심장 좌심실에서의 수축기 혈압(left ventricular systolic pressure, LVSP)을 측정하였다.

- 12> 좌심실 비대(left ventricular hypertrophy)는 생후 19 주령의 형질전환 마우스의 체중(body weight, BW, 단위 g)에 대한 좌심실무게(left ventricular weight, LVW, 단위 mg) 비를 측정하여, 그 정도를 확인하였다.
- 13> 이상의 실험 결과는 도 5a 내지 5c 및 도 6에 각각 나타내었다.
- 14> 도 5a 내지 5c는 TCTP 과다발현 형질전환 마우스에서 고혈압 증상을 확인한 도로, Tg은 형질전환 마우스, Lm은 대조군으로서 한배자손 중 형질전환되지 않은 것(Littermate)이고, M은 수컷, F는 암컷을 의미한다.
- 95> 도 5a 내지 5c에 나타난 바와 같이, TCTP 과다발현 형질전환 마우스는 정상 마우스에 비해 암수 모두의 꼬리에서 측정한 수축기 혈압(T-SBP)이 컨트롤에 비하여 15 mmHg 이상 상승하여, 고혈압 증세를 나타냈다. 경동맥 수축기 혈압(C-SBP) 및 심장 좌심실에서 측정한 수축기 혈압(LVSP) 또한 TCTP 과다발현 형질전환 마우스가 컨트롤에 비하여 15-20 mmHg 정도 상승하였으며, 이러한 고혈압 증상은 생후 약 6주령 이상의 TCTP 과다발현 형질전환 마우스부터 나타남을 확인할 수 있었다.
- 96> 또한 도 6은 본 발명의 형질전환 마우스가 생후 19주령 되었을 때, 좌심실비대를 확인한 결과도로, 체중(BW, 단위 g)에 대한 좌심실무게(LVW, 단위 mg)비로 표현되었다. 도 6에서 가로축의 1은 대조군 암컷, 2는 형질전환 마우스 암컷, 3은 대조군 수컷, 4는 형질전환 마우스 수컷을 나타낸다.

- 7> 도 6에 나타난 바와 같이, TCTP 과다발현 형질전환 마우스는 대조군에 비해 암수 모두 심장비대증을 나타냄이 확인되었다.
- 18> 이와 같이 본 발명의 조성물은 고혈압 및 심장비대증을 유발하므로, 본 발명의 조성물과 반응하는 물질을 스크리닝함으로써 항고혈압제 후보물질을 개발할 수 있다.
- 19> 본 발명의 TCTP를 과다발현하는 형질전환 마우스는 고혈압 및 심장비대증을 표현형으로 나타내어, 고혈압 또는 심장비대의 치료 및 개선을 위해 개발된 시험대상물질을 투여하여 치료 및 개선 정도를 관찰함으로써, 시험대상물질 스크리닝시 유용하게 사용될 수 있다.

【발명의 효과】

- 20> 본 발명의 조성물은 고혈압 및 심장비대증을 유발하는 효과가 있다.
- 21> 따라서, 본 발명의 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법은 항고혈압제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.
- 22> 또한, 본 발명의 형질전환 마우스는 고혈압 및 심장비대증을 표현형으로 나타내어, 고혈압 또는 심장비대의 치료 및 개선을 위해 개발된 시험대상물질을 스크리닝할 때 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

포유류의 TCTP 유전자를 포함함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 TCTP 유전자는 서열번호 1의 염기서열 구조, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 것 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물.

【청구항 3】

포유류의 TCTP 단백질을 포함함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝용 조성물.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 TCTP 단백질은 서열번호 2의 아미노산 구조를 갖거나, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현될 수 있으며, TCTP와 동등한 생리적 활성을 나타내는 폴리펩티드 단편인 항고혈압제 스크리닝용 조성물.

【청구항 5】

제 1항 또는 제 2항의 조성물을 표적물질로 이용함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 유전자의 발현을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

【청구항 7】

제 3항 또는 제 4항의 조성물을 표적물질로 이용함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 유전자의 발현을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, TCTP 유전자 또는 단백질과 시험대상물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), TCTP 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법임을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

【청구항 10】

수정란 단계에서 포유류의 TCTP 유전자가 도입되어, 체세포와 생식세포에 포유류의 TCTP 유전자를 포함하고, 이로부터 TCTP 단백질이 과다발현되어 고혈압 및 심장비대증의 표현형을 나타내는 형질전환 마우스.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 TCTP 유전자는 서열번호 1의 염기서열 구조, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 것 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 형질전환 마우스.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 TCTP 유전자는 사이토메갈로 바이러스 인핸서(CMV-IE), 치킨 베타 액틴 프로모터(chicken beta-actin promoter) 및 래빗 베타 글로빈 폴리 에이 테일(rabbit beta-globin poly A-tail)을 함유하는 벡터 DNA 내에 삽입된 것임을 특징으로 하는 형질전환 마우스.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 형질전환 마우스의 수정란은 수탁번호 KCTC 10640BP로 기탁된 것인 형질전환 마우스.

【청구항 14】

다음 단계로 이루어지는 TCTP 과다발현 형질전환 마우스 제조방법;

1) 포유류의 TCTP 유전자를 형질전환 벡터에 삽입시켜 형질전환용 재조합 유전자 구조물을 제조하는 제 1단계;

2) 상기 제 1단계의 재조합 유전자 구조물을 마우스의 수정란의 응성 전핵에 미세주입하는 제 2단계;

3) 상기 미세주입된 수정란을 대리모 마우스에 이식하는 제 3단계; 및

4) 상기 대리모 마우스의 자손 중 TCTP 유전자가 게놈 DNA에 삽입되고, TCTP 단백질을 발현하며, 고혈압 또는 심장비대증의 표현형을 나타냄을 확인하여 TCTP 과다발현 형질전환 마우스를 선별하는 제 4단계.

【청구항 15】

제 14항에 있어서, 상기 TCTP 유전자는 서열번호 1의 염기서열 구조, 또는 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 또는 재배열 돌연변이가 일어난 것 중 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 TCTP 과다발현 형질전환 마우스 제조방법.

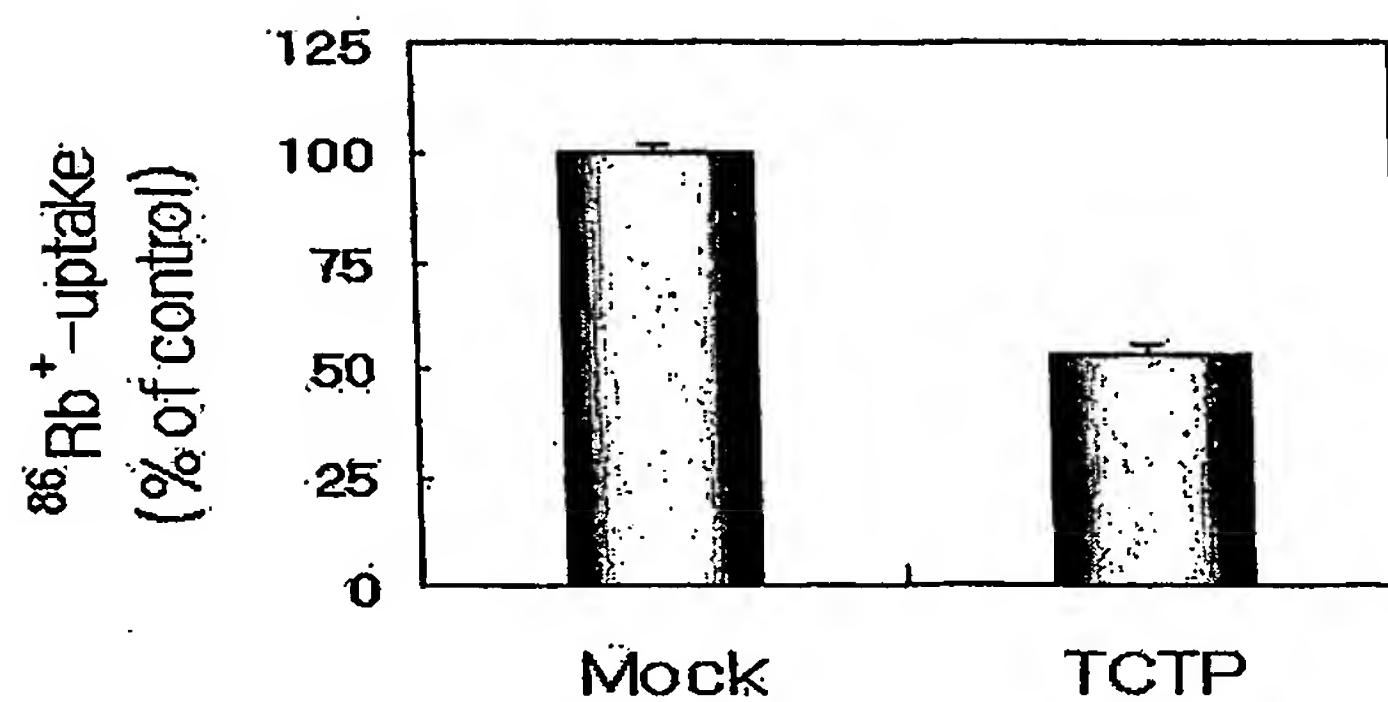
【청구항 16】

제 10항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 형질전환 마우스에 시험대상물질을 투여한 후 고혈압 및 심장비대증의 증상 개선 정도를 관찰하여 스크리닝함을 특징으로 하는 항고혈압제 스크리닝 방법.

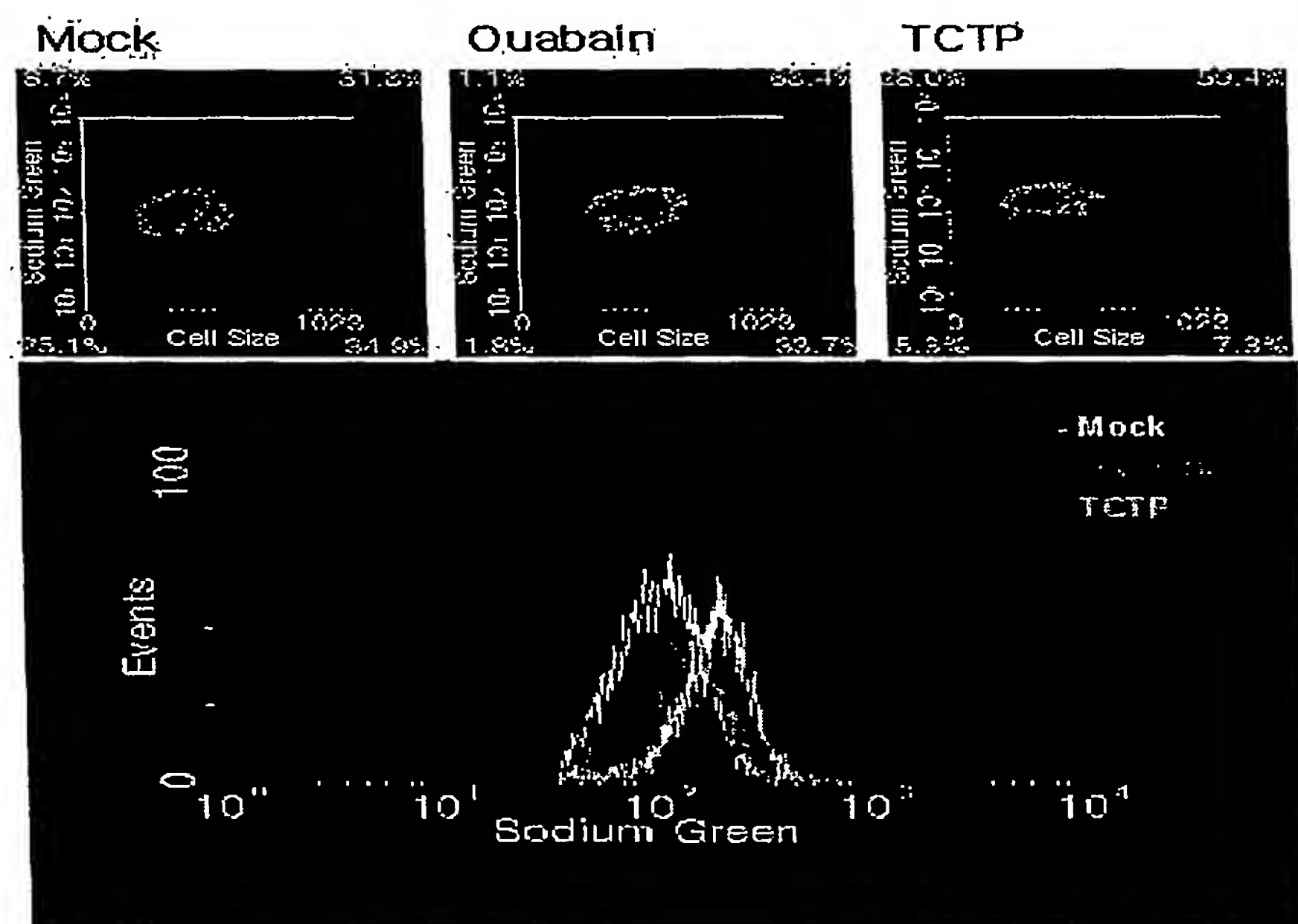
【도면】

【도 1】

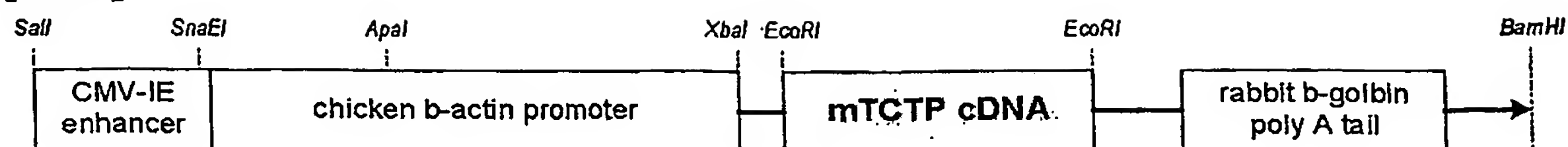
a



b



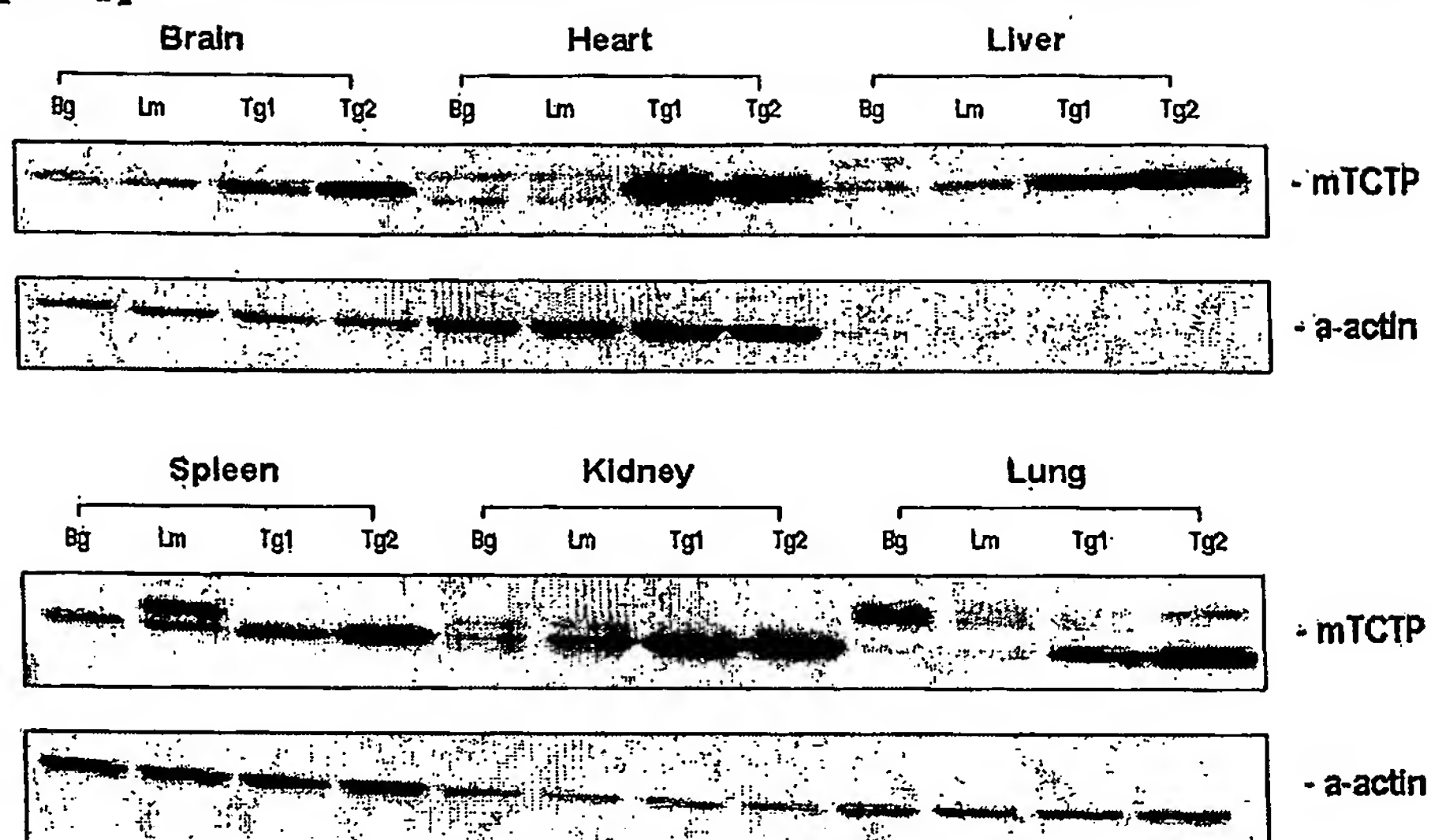
【도 2】



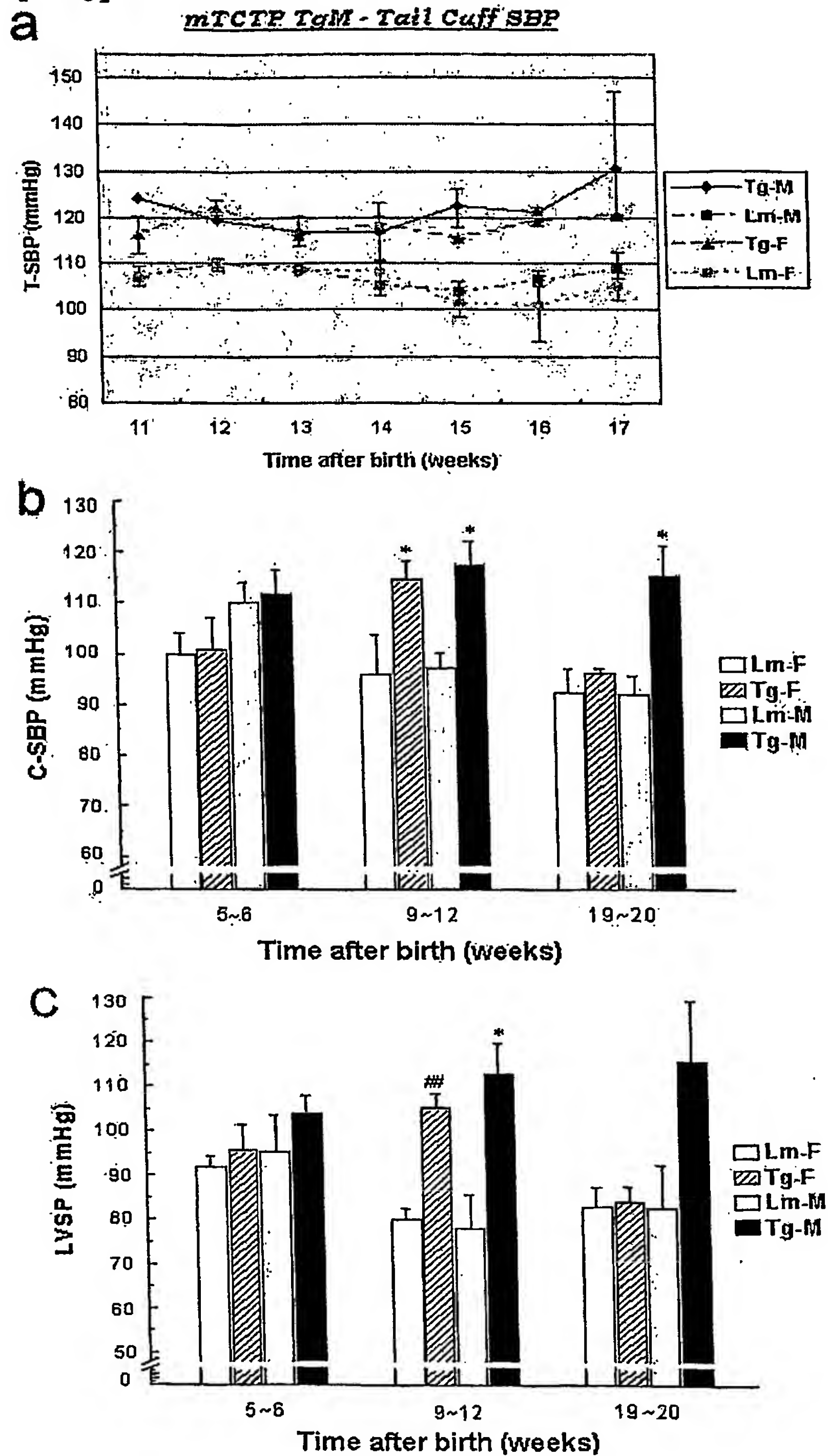
【도 3】



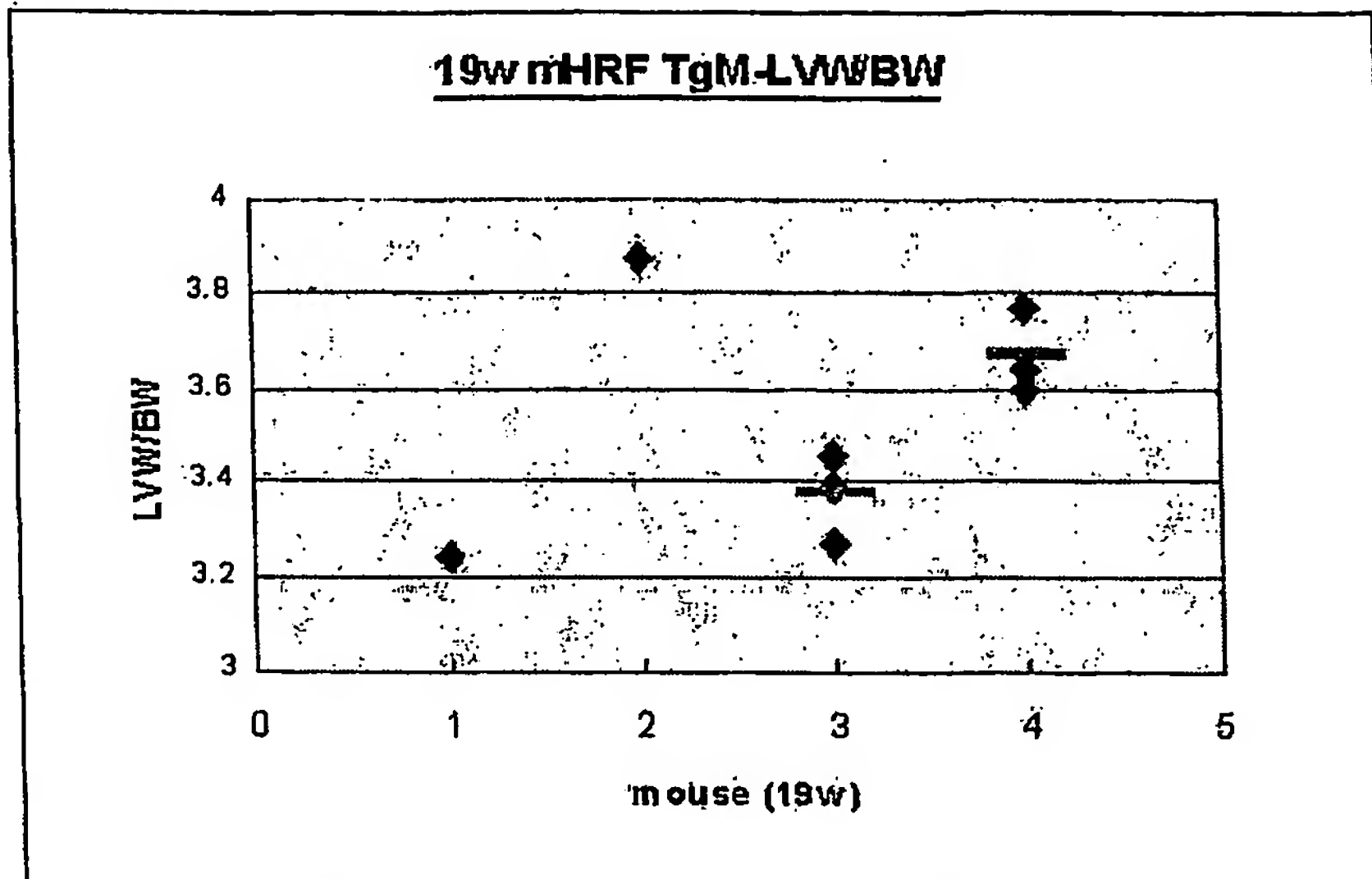
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【서열목록】

<110> LEE, Kyung lim <120> Composition for screening anti-hypertension drug comprising
mammal TCTP gene or its protein product, and method for screening anti-hypertension drug using
said composition <130> 04p-55 <150> KR 10-2003-0040519 <151> 2003-06-21 <160> 2 <170>
KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 858 <212> DNA <213> Homo sapiens <220> <221> mRNA <222>
(1)..(858) <223> TCTP gene <400> 1 cgctccccc tcccccgag cgccgctccg gctgcaccgc gctcgctccg agtttcaggc
60 tcgtgctaag ctagcgccgt cgctgctcct cttcagtcgc catcatgatt atctaccggg 120 acctcatcag ccacgatgag
atgttctccg acatctacaa gatccgggag atcgcgagac 180 ggttgtgcct ggaggtggag gggaagatgg tcagtaggac
agaaggtaac attgatgact 240 cgctcattgg tggaaatgcc tccgctgaag gccccgaggg cgaaggtacc gaaagcacag
300 taatcactgg tgctgatatt gtcatgaacc atcacctgca ggaacaagt ttcacaaaag 360 aagcctacaa gaagtacatc

```

aaagattaca tgaaatcaat caaagggaaa ctigaagaac          420 agagaccaga aagagtaaaa ccttttatga caggggctgc
agaacaaatc aagcacatcc          480 ttgctaattt caaaaactac cagttcttta ttggtgaaaa catgaatcca gatggcatgg
540 ttgctctatt ggactaccgt gaggatgggtg tgaccccata tatgattttc ttttaaggatg          600 gtttagaaat ggaaaaatgt
taacaaatgt ggcaattatt ttggatctat cacctgtcat          660 cataactggc ttctgcttgt catccacaca acaccaggac
ttaagacaaa tgggactgat          720 gtcactttga gctcttcatt tattttgact gtgatttatt tggagtggag gcattgtttt
780 taagaaaaac atgtcatgta ggttgtctaa aaataaaatg catttaaact caaaaaaaaaa          840 aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
858 <210>      2 <211>      172 <212>      PRT <213>      Homo sapiens <220> <221>      CHAIN <222>      (1)..(172) <
223>      TCTP protein <400>      2 Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp      1
5              10              15  Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
20              25              30  Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Il
35              40              45  Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Se
50              55              60  Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Gl
65              70              75              80  Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Ty
Ile Lys Asp Tyr Met              85              90              95  Lys Ser Ile Lys Gly Lys
Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys              100              105              110  Pro Phe
Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn              115              120              12
Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly              130              135
140  Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met 145              150
155              160  Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys              165
170

```


**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.